



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"

Utilização de *Agrobacterium rhizogenes* para Produção de Culturas de Raízes de Milho

Andrea Almeida Carneiro⁽³⁾; Amanda Naye Guimarães⁽¹⁾; Meire de Cassia Alves⁽²⁾; Newton Portilho Carneiro⁽³⁾.

⁽¹⁾Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida - Sete Lagoas / MG; ⁽²⁾ Analista da Embrapa Milho e Sorgo; ⁽³⁾ Pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo.

RESUMO: Um dos métodos mais utilizados para a transformação genética de plantas é via inoculação com bactérias do gênero *Agrobacterium*. A transformação natural por *Agrobacterium* ocorre apenas em dicotiledôneas, pois monocotiledôneas não são hospedeiras naturais desta bactéria. Entretanto, nas últimas décadas novas descobertas sobre este processo de transformação têm sido acumuladas possibilitando a transformação de monocotiledôneas, como o milho (Ishida *et al.*, 2003; Frame *et al.*, 2006). *A. rhizogenes* é um patógeno responsável pela formação do fenótipo conhecido como raízes em cabeleiras ou "hairy roots". Apesar da transformação por *Agrobacterium* introduzir de uma única ou poucas cópias do transgene no genoma da planta, ainda apresentam um tempo longo para estudos de plantas T1 e a necessidade de manutenção de um grande número de eventos em casas-de-vegetação certificadas para a biossegurança. Portanto, é muito importante desenvolver um modelo de transformação eficiente, simples, rápido e econômico, para linhagens de milho que permita estudos mais *in vivo* de um número maior de genes de interesse e/ou características associadas ao sistema radicular. Este estudo teve como objetivo avaliar a virulência de quatro linhagens de *A. rhizogenes*, A4, 8196, 2659 e R1601 para embriões imaturos zigóticos do milho Hi-II. As cepas utilizadas para a infecção continham o plasmídeo binário pTF102 que contém os cassetes gênicos 35SP::gus::35ST e 35SP::bar::vspT. Após a infecção com *A. rhizogenes* os embriões imaturos de milho foram transferidos para o meio de co-cultivo durante cinco dias e a expressão transiente de GUS foi utilizada para determinar a eficiência de infecção das diferentes estirpes testadas. Os genes *bar* e *rol* foram detectadas por PCR, em algumas das raízes geradas. Os resultados confirmam que as *A. rhizogenes* foi capaz de infectar embriões imaturos de milho Hi-II, sendo que eficiência foi maior para as cepas A4.e R1601.

Termos de indexação: *Agrobacterium rhizogenes*; raízes em cabeleira; transformação genética; *Zea mays*.

INTRODUÇÃO

A transformação genética de milho via *A. rhizogenes* com a consequente geração de culturas de raízes apresenta algumas vantagens sob a transformação com *A. tumefaciens*, para estudos de genômica de raiz: (1) Raízes adventícias transformadas podem ser geradas mais facilmente em um curto espaço de tempo (entre 2 e 4 semanas) (Xu *et al.*, 2006); (2) Genes inseridos em plasmídeos binários podem ser co-transformados; (3) Cada raiz formada é derivada de uma única célula, o que evita a presença de quimeras nas culturas de raízes; (4) Raízes podem ser propagadas clonalmente em meio de cultivo simples; (5) Clones de raízes podem ser mantidos indefinidamente *in vitro* através de repicagens sucessivas; (6) Do ponto de vista da biossegurança ambiental, culturas de raízes transgênicas são mais simples de manipular do que as plantas transgênicas; (7) Raízes geradas por *A. rhizogenes* têm o potencial de serem colonizadas por microrganismos simbióticos e parasíticos viabilizando estudos destas interações (Harrison e Buuren, 1995; Fortin *et al.*, 2002; Alpizar *et al.*, 2006; Bosselut *et al.*, 2011).

O objetivo deste estudo foi definir a virulência e alguns parâmetros de infecção das cepas de *A. rhizogenes* A4, R1601, 2659 e 8196 para o milho. Em projetos posteriores, utilizaremos a metodologia desenvolvida para estudos de genes relacionados a estresses abióticos e bióticos em raiz, assim como para estudos de genes relacionados a interações simbióticas (fungos micorrízicos e/ou microrganismos fixadores de nitrogênio e promotores de crescimento) ou

parasíticas (nematódeos) que acontecem nas raízes de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

O genótipo utilizado neste protocolo é o milho Hill (Armstrong et al., 1991). A esterilização e coleta de embriões de milho foram realizadas de acordo com Petrillo *et al.* (2008). Para a transformação coletou-se embriões imaturos de 1,8 – 2,0 mm de comprimento (10 -12 dias após a polinização). Para esterilização as espigas foram mergulhadas em uma solução de 1:1 de água sanitária comercial e H₂O destilada com 1-2 gotas de Tween 20 durante 20 minutos. Quatro estirpes de *A. rhizogenes* R1601, A4, 2659 e 8196, pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, foram comparadas quanto a sua eficiência de transformação de milho.

O protocolo utilizado para a transformação genética de milho foi adaptado dos procedimentos publicados por Frame *et al.* (2006) e Xu *et al.* (2006). Inicialmente *A. rhizogenes* foi plaqueada em meio YEP a partir de uma cultura estoque mantida em glicerol a -80°C. Para a transformação genética, foi feita uma estria da *Agrobacterium* utilizando uma colônia isolada, em meio YEP e incubada por 2 a 5 dias a 19°C. Antes da transformação a *Agrobacterium* foi ressuspensa em meio de infecção suplementado com acetoseringona e mantida sob agitação de 150 rpm a 23°C.

Foram utilizados 100 embriões para cada tratamento, divididos em 5 placas, sendo cada placa considerada uma repetição. Embriões foram coletados em microtubos de 1,5 ml (50 embrião/tubo) contendo meio de infecção. Momentos antes da infecção todo o meio foi removido e 1 ml da cultura bacteriana adicionado. Após a infecção, os embriões foram transferidos para a superfície do meio de co-cultivo (Frame *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006), com o eixo embrionário em contato com o meio. As placas foram incubadas a 20°C por 7 dias.

Após o período de co-cultivo, 10% dos embriões foram utilizados nos ensaios histoquímicos de GUS e o restante transferido para o meio de formação de raízes (Frame *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006) suplementado com 250 mg/l de cefotaxime a 28°C (escuro) durante 14 dias.

Raízes começaram a ser formadas nos explantes a partir da segunda semana de incubação. Quando as raízes atingiram aproximadamente 3 cm de comprimento, elas foram individualizadas e transferidas para meio MS (Murashige and Skoog, 1937) suplementado com cefotaxime.

O DNA de raízes transformadas foi extraído de acordo com Sambrook et al. (1989). As sequências dos primers *rol*, *vir* e *aux* utilizados na caracterização molecular das *A. rhizogenes* e das

raízes transgênicas foram de acordo com Alpizar et al. (2008).

As reações de PCR para a amplificação de DNA genômico foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo 5 µM de cada primer; 1,0 µl do tampão de reação 10 X; 1,0 µl de MgCl₂ 50mM; 1,0 µl de dNTPs (2,5mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,5 U de Taq DNA polimerase. Amostras foram amplificadas usando uma desnaturação inicial de 94°C por 2 min; seguida de 30 ciclos (94°C por 15 s, 50°C por 15 s, 72°C por 15 s) e uma extensão final de 2 min a 72°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a transformação de embriões imaturos de milho foram utilizadas as estirpes de *A. rhizogenes* R1601, 2659, 8196 e A4. Primers específicos para os genes *vir*, *rol* e *aux* presentes no plasmídeo Ri, desenhados para a caracterização das raízes transgênicas, foram testados, inicialmente, para a amplificação do DNA genômico das *A. rhizogenes*.

Os genes *vir* se localizam na região de virulência do plasmídeo Ri e são responsáveis pela cópia e transferência à célula vegetal do T-DNA, entretanto estes genes não são transferidos para a célula vegetal. Na Figura 1 podemos observar que os primers específicos para o gene *virD1* foram capazes de amplificar o DNA total das quatro cepas de *A. rhizogenes* utilizadas, por outro lado o par de primers para o gene *virG* amplificou apenas o DNA genômico da estirpe R1601.

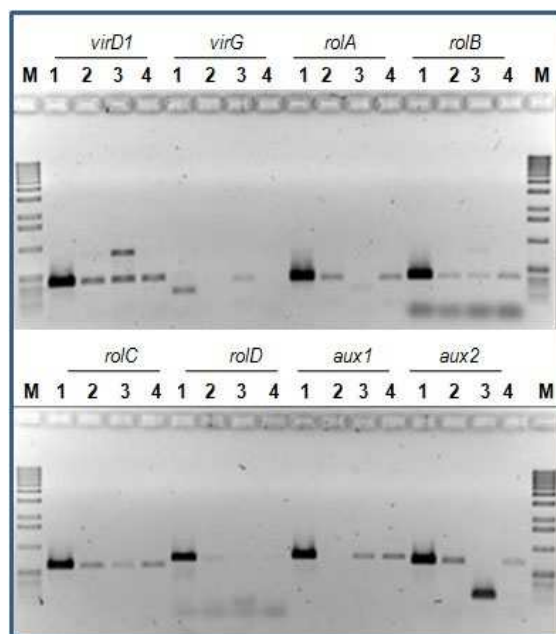


Figura 1: Amplificação pela PCR de DNA genômico de *Agrobacterium rhizogenes* (1) *A. rhizogenes* R1601; (2) *A. rhizogenes* 2659; (3) *A. rhizogenes* 8196; (4) *A. rhizogenes* A4. *virD1*, *virG*, *rolA*, *rolB*,

rolC, rolD, aux1, aux2: primers utilizados nas reações de PCR.

Os genes *rol* estão localizados no T-DNA do plasmídeo Ri e quando transferidos para a célula vegetal induzem a formação das raízes em cabeleira. Primers para os genes *rolA* foram capazes de amplificar o DNA total das bactérias R1601, 2659 e A4. Os genes *rolB* e *rolC* foram amplificados nas quatro cepas de *A. rhizogenes*, por seus respectivos primers. Os primers para o gene *rolD* amplificaram apenas o DNA genômico das bactérias R1601 e 2659.

Os genes *aux* são responsáveis pela síntese de auxina endógena e, também, estão localizados no T-DNA do plasmídeo Ri. As reações de PCR utilizando os primers específicos para o gene *aux1*, também conhecido como *iaaM*, amplificaram o DNA das bactérias R1601, 8196 e A4. Já as reações com os primers específicos para o gene *aux2*, conhecido também como *iaaH*, amplificaram genes nas cepas R1601, 2659 e A4.

Os pares de primers *virD1*, *rolB* e *rolC*, amplificaram os genes *virD1*, *rolB* e *rolC* no DNA das 4 estirpes de *A. rhizogenes*. Portanto, estes primers foram utilizados para a caracterização molecular das raízes transgênicas de milho. O gene *virD1* foi utilizado como um controle para comprovar que as raízes produzidas estavam livres de contaminação por *A. rhizogenes*, uma vez que tal gene só auxilia no processo de transferência do T-DNA para a célula vegetal. Os primers para os genes *rolB* e *rolC* foram utilizados para a confirmação da transgenia das raízes estudadas.

Os resultados da transformação genética do milho com as diferentes estirpes de *A. rhizogenes* podem ser observados na Figura 2 e 3. A *A. rhizogenes* A4 foi a que apresentou a maior eficiência de infecção de embriões imaturos de milho (Figura 2). Hongwei et al (2006) testaram as estirpes de *A. rhizogenes* ATCC15834, A4 e R1604 na produção de plantas de milho transgênico. Milho transgênico foi obtido após a infecção de calos com as estirpes ATCC15834 e A4.

Uma raiz originada de cada transformação com as diferentes cepas de *A. rhizogenes* R1601, 8196 e A4, com crescimento vigoroso em meio de cultivo, foi selecionada para os estudos moleculares. Nenhuma raiz produzida pela cepa 2659 apresentou alta taxa de crescimento, não sendo, portanto, utilizada nesta análise.

O resultado da PCR realizada com o DNA extraído das raízes de milho transgênicas, utilizando os primers *virD1*, *rolB* e *rolC* pode ser observada na Figura 4. O primer *virD1* amplificou somente o DNA total de *A. rhizogenes*, sendo um resultado esperado, pois o gene *virD1* não é transferido para a célula vegetal e deve ser encontrado apenas na *Agrobacterium*. Este resultado mostra que não existe contaminação de *A. rhizogenes* nas raízes analisadas.

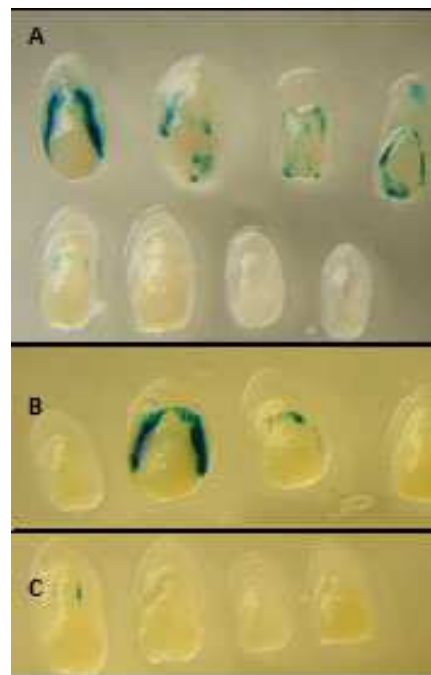


Figura 2 - Infecção de embriões imaturos de milho Hill com *A. rhizogenes* contendo o plasmídeo pTF102. (A) Estirpe A4; (B) Estirpe R1601; (C) Estirpe 8196.

DNA total das raízes selecionadas baseado no crescimento ativo na ausência de reguladores de crescimento vegetal, em meio de cultivo foi amplificado com os primers *rolB* e *rolC*, provando a natureza transgênica destas raízes (Figura 4). Spena et al. (1987) mostraram que a presença de mais de um gene *rol* na raiz transgênica produz um fenótipo de raiz em cabeleira mais acentuado, pois estes genes atuam de maneira sinérgica. Sendo que o gene *rolB* é o mais eficiente na indução das raízes e quando mutado não é capaz de induzir a formação de raízes *in vitro* (Spena et al., 1987).

Raízes transgênicas foram produzidas pelas cepas A4, R1601 e 8196. A4 e R1601 são estirpes classificadas como dos tipos agropina, enquanto que a 8196 é do tipo mannopina. Isolados produtores de agropina são eficientes na transformação de uma grande variedade de espécies de plantas e seu plasmídeo Ri contém o TL e TR-DNA (Jouanin, 1984; Huffman et al., 1984). O TR T-DNA contém genes de indução de tumor (síntese de auxina *tms1* e *tms2*) homólogos aos do plasmídeo Ti de *A. tumefaciens* (Huffman et al., 1984; Jouanin, 1984) e, genes envolvidos na biossíntese de agropino (*ags*) (Huffman et al., 1984). Mutagênese desta região do plasmídeo Ri resulta na perda ou atenuação da virulência (White et al., 1985). Genes presentes no TL-DNA direcionam a síntese de substâncias responsáveis pela

diferenciação das células em raízes, os genes *rol* (root locus) (Shen *et al.*, 1988).

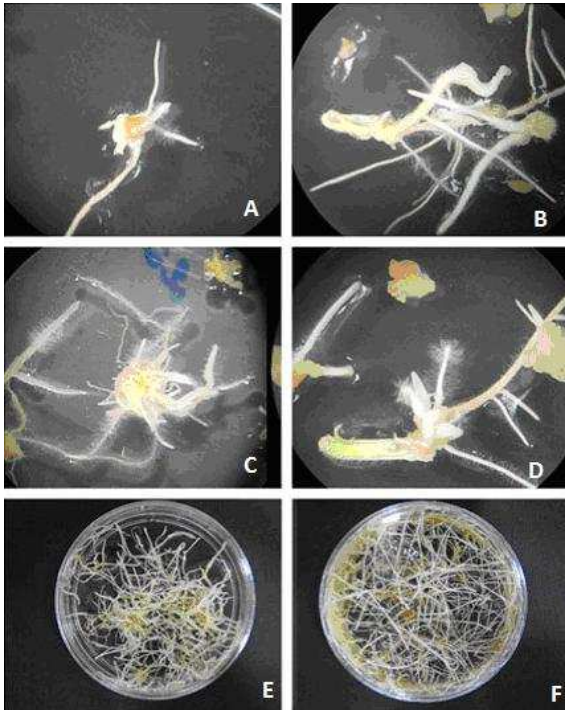


Figura 3: Formação de raízes transgênicas em embriões imaturos de milho. (A) *A. rhizogenes* 2659; (B) *A. rhizogenes* A4; (C) *A. rhizogenes* 8196; (D) *A. rhizogenes* 1601 após 2 semanas de inoculação; (E e F) Raízes transgênicas após 4 semanas em meio de cultivo GE.

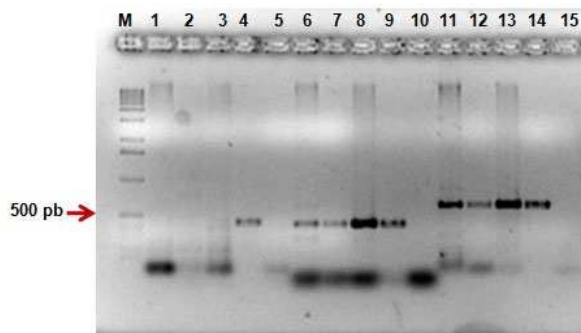


Figura 4: PCR DNA raízes de milho transgênicas: (1 a 5) Amplificação pela PCR com primers para o gene *virD1*; (1) milho Hill *A. rhizogenes* R1601; (2) milho Hill *A. rhizogenes* A4; (3) milho Hill *A. rhizogenes* 8196; (4) *A. rhizogenes* DNA total; (5) controle negativo; (6 a 10) Amplificação pela PCR com primers para o gene *rolB*; (6) milho Hill *A. rhizogenes* R1601; (7) milho Hill *A. rhizogenes* A4; (8) milho Hill *A. rhizogenes* 8196; (9) *A. rhizogenes* DNA total; (10) controle negativo; (11 a 15) Amplificação pela PCR com primer para o gene *rolC*; (11) milho Hill *A. rhizogenes* R1601; (12) milho Hill *A. rhizogenes* A4; (13)) milho Hill *A.*

rhizogenes 8196; (14) *A. rhizogenes* DNA total; (15) controle negativo. (M) Marcador molecular lambda 1 Kb.

CONCLUSÕES

As cepas de *Agrobacterium rhizogenes* R1601, A4 e 8196 são capazes de transformar o milho Hill, produzindo culturas de raízes que podem ser mantidas *in vitro* por longos períodos de tempo.

A disponibilidade de clones de raízes de milho de longa duração *in vitro* será útil para os estudos de análises funcionais de genes expressos nas raízes. E também, para estudos de interações planta-microrganismos, tais como fungos micorrízicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG e CNPq que promovem atividades de fomento, apoio e incentivo a pesquisas científicas e tecnológicas em Minas Gerais, possibilitando a realização do estudo por meio do fornecimento de auxílio financeiro, e à Embrapa Milho e Sorgo pela concessão de bolsa de estudo durante o período de realização do trabalho.

REFERÊNCIAS

ALPIZAR, E.; DECHAMP, E.; LAPEYRE-MONTES, F.; GUILHAUMON C.; BERTRAND, B.; JOURDAN, C.; LASHERMES, P.; ETIENNE H. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. **Annals of Botany**, London, v. 101, p. 929-940, 2008.

ARMSTRONG, C. L.; GREEN, C. E.; PHILLIPS, R. L. Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, v. 65, p. 92-93, 1991.

BOSELUT N.; GHELDER, C. V.; CLAVERIE, M.; VOISIN, R.; ONESTO, J. P.; ROSSO, M. N.; ESMENJAUD, D. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Prunus* as an alternative for gene functional analysis in hairy-roots and composite plants. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 1, p. 167-177, 2011.

FORTIN, J. A.; BÉCARD, G.; DECLERCK, S.; DALPÉ, Y.; ST-ARNAUD, M.; COUGHLAN, A. P.; PICHÉ, Y. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 80, p. 1-20, 2002.

- FRAME, B. R.; MCMURRAY, J. M.; FONGER, T. M.; MAIN, M. L.; TAYLOR, K. W.; TORNEY, F. J.; PAZ, M. M.; WANG, K. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 25, p. 1024-1034, 2006.
- HARRISON, M. J.; VAN BUUREN, M. L. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, London, v. 378, p. 626-629, 1995.
- HUFFMAN, G. A.; WHITE, F. F.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Hairy-root-inducing plasmid: physical map and homology to tumor-inducing plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 157, n. 1, p. 269-276, 1984. .
- ISHIDA, Y.; SAITO, H.; HIEI, Y.; KOMARI, T. Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 57-66, 2003.
- JOUANIN, L. Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies with Ti plasmids. **Plasmid**, New York, v. 12, n. 2, p. 91-102, 1984.
- PETRILLO, C. P.; CARNEIRO, N. P.; PURCINO, A. A. C.; CARVALHO, C. H. S.; ALVES, J. D.; CARNEIRO, A. A. Optimization of particle bombardment parameters for the genetic transformation of Brazilian maize inbred lines. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 3, p. 371-378, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory edition, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
- SHEN, W. H.; PETIT, A.; GUERN, J.; TEMPE, J. Hairy roots are more sensitive to auxin than normal roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 35, p. 3417-3421, 1988.
- SPENA, A.; SCHUMULLING, T.; KONEZ, C.; SCHELL, J. S. Independent and synergistic activity of rol A, B and C loci in stimulating abnormal growth in plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3891-3899, 1987.
- WHITE, F. F.; TAYLOR, B. H.; HUFFMAN, G. A.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Molecular e genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium-rhizogenes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 164, p. 33-44, 1985.
- XU, H.; ZHOU, X.; LU, J.; WANG, J.; WANG, X. Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* and production of regenerative plants in hairy root cultures in maize. **Science in China. Series C Life Sciences**, v. 49, n. 4, p. 305-310, 2006.



XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO

"Eficiência nas cadeias produtivas e o abastecimento global"